

Der inter- und postbalneologische
Hyaluronidasehemmungseffekt bei länger
dauernden Moorbadserien im Tierversuch

von

ERNST HAUPT

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. W. SEITZ

DER INTER- UND POSTBALNEOLOGISCHE HYALURONIDASE
HEMMUNGSEFFEKT BEI LÄNGER DAUERNDEN MOORBADSERIEN
IM TIERVERSUCH

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig - Maximilians - Universität zu München

vorgelegt von
Ernst Haupt
aus
Blumenau

München 1959



5349/60

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Referent: Professor Dr. W. Seitz

Dekan: Professor Dr. ~~K. Kelle~~ H. Schwegk

Tag der mündlichen Prüfung:

21. Dez. 1959

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
Problematik	5
Eigene Untersuchungen	9
I. Methodik	9
II. Versuchsreihen	10
1. Versuchsreihe	10
2. Versuchsreihe	14
3. Versuchsreihe	14
4. Versuchsreihe	30
Berechnungen und Statistik	35
Diskussion	51
Zusammenfassung	53
Literaturverzeichnis	54

PROBLEMATIK

In früheren Arbeiten haben MATHIES (1,2), MATHIES u.v. WERTHER (3) und RÖSCH (4) die Hyaluronidasehemmung nach Moorbrei- und Moorschwebstoffbädern verschiedener Moorvorkommen nachgewiesen. Die gefundenen Werte sind in den Tabellen 1 - 3 dargestellt. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass die bei intakten Ratten gefundene Hyaluronidasehemmung bei adrenaletomierten Ratten ausbleibt, bei hypophysektomierten Tieren erhalten ist. Es war daraus der Schluss zu ziehen, dass die Anwesenheit der Nebenniere für das Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung nach Moorbädern erforderlich ist. MATHIES (2) und JUNG (5) haben in Anlehnung an Versuche von DOMENJOZ (6), die dieser mit chemischen hyaluronidasehemmenden Substanzen durchgeführt hatte, nachweisen können, dass die bei intakten Ratten auftretende Ascorbinsäureabnahme in den Nebennieren nach Moorbädern bei hypophysektomierten Ratten ausbleibt. Dieser Ascorbinsäuredepletionseffekt wird als Ausdruck der inkretorischen Funktion der Nebenniere angesehen. Nach den Versuchen von MATHIES (2), MATHIES u. v. WERTHER (3) und RÖSCH (4) ist jedoch bei hypophysektomierten Ratten der hyaluronidasehemmende Effekt der Moorbäder erhalten, obwohl nach den Versuchen von MATHIES (2) und JUNG (5), wie erwähnt, die Ascorbinsäuredepletion ausbleibt. Es ist daraus gefolgert worden, dass nicht die Aktivität der Nebennierenrinde, sondern eine solche des Nebennierenmarkes für die Hyaluronidasehemmung durch Moorbäder notwendig sein muss. MATHIES (7) und SCHEUFELE (8) haben zeigen können, dass auch bei adrenaletomierten Ratten die Hormone des Nebennierenmarkes (Adrenalin und Noradrenalin) eine Hyaluronidasehemmung gleicher Größenordnung hervorrufen. Weiter wurde die Annahme einer Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark als Notwendigkeit für das Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung nach Moorbädern dadurch erhärtet, dass nach Versuchen von MATHIES (9) und SCHMIDT (10) die Hyaluronidasehemmung durch Adrenalin und Noradrenalin nach vorheriger Ergotamintartratinjektion ausbleibt. MATHIES (9) und LIGNAU (11) haben zeigen können, dass auch nach Moorbädern bei intakten Ratten die Hyaluronidasehemmung ausbleibt, wenn vorher Ergotamintartrat injiziert wird. Nach den Arbeiten von MATHIES(7)

und SCHEUFELE (8) tritt die Hyaluronidasehemmung nicht während der primären Katecholaminwirkung, sondern erst einige Zeit nach deren Abklingen auf. Es wurde deshalb nach einem Faktor gesucht, der am Ende einer durch die Katecholaminausschüttung in Gang gesetzten Reaktionsfolge letztlich die Hyaluronidasehemmung bedingt. Da das Heparin bei diesen Überlegungen mit in Betracht gezogen wurde, haben MATHIES und WALCHER (12) und MAXEIN (13) Untersuchungen über die hyaluronidasehemmende Wirkung des Heparins in vivo bei Ratten durchgeführt. Diese Autoren fanden, dass die unter Heparin auftretende Hyaluronidasehemmung sowohl bei intakten als auch bei adrenaletomierten Ratten statistisch gesichert vorhanden ist, dass diese jedoch bei vorheriger Protaminsulfat-injektion, das bekanntlich Heparin inaktiviert, ausbleibt. MATHIES (14) hat zeigen können, dass auch die hyaluronidasehemmende Wirkung der Moorbäder verschwindet, wenn vor dem Bad Protaminsulfat injiziert wird. Eine Mitwirkung des Heparins beim Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung auf dem Wege über eine Katecholaminausschüttung des Nebennierenmarkes gewinnt durch diese Ergebnisse an Wahrscheinlichkeit.

Um den therapeutischen Gegebenheiten einer erst nach längerer Moorkur und vor allem auch der oft erst längere Zeit nach dem letzten Bade auftretenden therapeutischen Wirkung des Moorbades näherzukommen, sollten in der vorgelegten Arbeit die Verhältnisse geklärt werden, die im Verlaufe und nach einer länger dauernden Moorbäderserie vorliegen. Zum Vergleich wurde auch die Hyaluronidasehemmung bestimmt, die vier Wochen nach einem einmaligen Moorbade vorliegt. Ebenso sollte auch festgestellt werden, wie sich die Werte bei unbehandelten Tieren verhalten.

Zeit- punkt nach Schweb- stoff	Farbstoff-Quaddel		Farbst.v.Hyaluroni-		Tier- zahl	Hyal.- Hemmung in %
	in qmm		dase-Quaddel i.qmm			
	vor	nach	vor	nach		
		30'-Bad		30'-Bad		
20'	$\bar{x}$	127	109	177	4	34,3
30'	$\bar{x}$	128	120	189	5	36,4
40'	$\bar{x}$	128	123	179	4	36,0
60'	$\bar{x}$	129	126	175	4	19,6
90'	$\bar{x}$	127	114	179	4	23,1
120'	$\bar{x}$	129	115	203	6	33,9
150'	$\bar{x}$	130	124	205	5	2,1
20' n. Wasserb.	$\bar{x}$	138	129	209	4	- 2,8

Tabelle 1

Zeit- punkt	Farbstoff-Quaddel		Farbst.u.Hyaluroni- dase-Quaddel		Tier- zahl	Hyal.- Hemmung in %
	in qmm		i.qmm			
	vor 30'-Bad	nach	vor 30'-Bad	nach		
20'	$\bar{x}$	129	114	192	5	63,3
30'	$\bar{x}$	126	121	182	4	50,5
40'	$\bar{x}$	129	121	175	5	29,3
60'	$\bar{x}$	124	122	185	4	19,7
90'	$\bar{x}$	122	114	185	4	33,3
120'	$\bar{x}$	138	129	202	5	17,5
150'	$\bar{x}$	138	130	202	5	55,0

Tabelle 2

Reichenhaller Moorbrei (3:4)

Zeit- punkt	Farbstoff-Quaddel		Farbst.u.Hyaluroni- dase-Quaddel 1.qmm		Tier- zahl	Hyal.- Hemmung in %	
	in qmm						
	vor 30'-Bad	nach	vor 30'-Bad	nach			
20'	$\bar{x}$	127	114	183	172	4	19,6
30'	$\bar{x}$	127	128	183	188	4	- 8,9
40'	$\bar{x}$	118	114	195	178	7	23,0
60'	$\bar{x}$	125	123	188	171	7	27,0
90'	$\bar{x}$	135	128	205	179	6	37,7
120'	$\bar{x}$	133	129	216	189	4	32,5
150'	$\bar{x}$	137	125	226	193	5	36,9

Tabelle 3

Reichenhaller Schwebstoff (1:500)

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. Methodik:

Als Kriterium für die Hyaluronidasewirkung und deren Hemmung diente der sog. Spreading-Test, d.h. die Diffusionsgeschwindigkeit einer Farbstoffquaddel mit Evansblau bei Ratten (15 - 21). Es wurden ausschliesslich männliche Ratten mit einem Anfangsgewicht von 125 - 170 Gramm verwendet, und zwar wegen ihrer glatten Bauchhaut, die sich ohne grosse Schwierigkeit mit Enthaarungsmittel (Pilca) enthaaren liess. Diese so schonend enthaarte Bauchhaut war sowohl für die Injektion der Evansblaufarbstofflösung als auch für deren Ausbreitung im intrakutanen Gewebe sehr gut geeignet. Da nach MADINAVEITIA (20) nur in der ersten Phase - i.e. innerhalb der ersten zehn Minuten - der meist zweiphasig ablaufenden Spreading-Reaktion ein Effekt der angewandten Hyaluronidase vorliegt, wurde von anderen Methoden abgesehen, bei denen die gesetzten Farbstoffquaddeln nicht fortlaufend kontrolliert und innerhalb der ersten zehn Minuten gemessen werden konnten. Nach GIBIAN (22) ist die durch die Hyaluronidase bewirkte beschleunigte Diffusion einer Quaddel im intrakutanen Gewebe auf den Druck zurückzuführen, der von dem gesetzten Flüssigkeitsdepot auf das umgebende Gewebe ausgeübt wird, zumindest innerhalb der ersten zehn Minuten. Dann sollen überwiegend Resorptionsvorgänge in Funktion treten.

Um die Farbstoffquaddeln in grösster Ruhe des Tieres setzen zu können, wurden die Tiere narkotisiert. Die Narkose wurde mit Evipan-Natrium, 0,2 ccm pro 100 g Tier subcutan, durchgeführt. Die eben genannte Dosis von 0,2 ccm Evipan-Na war zu Beginn der Versuchsreihen die Maximaldosis, die jedoch nach zwei Monaten auf die doppelte Menge hinaufgesetzt werden musste, also auf 0,4 ccm / 100 g Tier. Es wurde immer nur frische zehnprozentige Evipan-Natrium-Lösung verwendet, und zwar 5 ccm aq. bidest. auf eine Ampulle von 5 mg Evipan-Na.

Bei der Enthaarung der Bauchhaut mit Schere und Pilca (Enthaarungsmittel) wurde jede Verletzung der Epidermis vermieden, da diese Tiere wegen Lieferung ungenauer Werte nicht zu verwenden sind.

Die Setzung der Quaddeln erfolgte mit einer 1 ccm-Rekordspritze, mit der 0,1 ccm Farbstofflösung (Evansblau) streng intrakutan injiziert wurde, was mittels einer scharfen, dünnen Kanüle (Nr.20) und durch Spannung der Bauchhaut möglich war. Das Evansblau wurde vorher mit physiologischer NaCl-Lösung auf 1 % einer 0,6 prozentigen Stammlösung verdünnt. Nicht genau intrakutan gesetzte Quaddeln wurden nicht abgelesen.

Bei Verwendung von Hyaluronidase (Kinetin) wurde eine Trockenampulle (= 150 I.E.) in 2 ccm der 0,06 prozentigen Evansblaulösung gelöst, bei der Injektion von 0,1 ccm kamen also 7,5 I.E. zur Wirkung.

Die Grösse der Bauchfläche der Tiere liess es zu, ohne eine Überschneidung der Quaddeln befürchten zu müssen, als Doppelbestimmung jeweils zwei Evansblau und je zwei Farbstoffhyaluronidase-Quaddeln symmetrisch zu setzen.

Das Ablesen der Quaddelkonturen erfolgte zehn Minuten nach Setzen der Quaddeln. Zur besseren Sichtbarmachung wurden die Konturen mit Tinte punktierend umrandet und dann auf einen durchsichtigen Zelluloidstreifen übertragen, der leicht auf die Quaddeln gelegt wurde. Diese eingeritzte Kontur wurde gleich mit der Nummer des betreffenden Tieres und mit "E" bei Evansblaufarbstoff und mit "H" bei Farbstoff u. Hyaluronidase versehen, sodass keine Verwechslung der Werte innerhalb der Tierreihe vorkam. Vom Zelluloidstreifen wurden die Quaddelflächen planimetrisch in Quadratmillimeter bestimmt.

II. Versuchsreihen

1. Versuchsreihe : Moor-KURZ-Versuch

Bei vier Tieren, die nur ein einmaliges Moorbad mit Neydhartinger Schwebstoff (Konzentration 1:500) erhalten, wird vier Wochen nach dem Bad die Hyaluronidasehemmung festgestellt. Die Dauer des Bades betrug 20 Minuten, die Badetemperatur 35-37°. Da nach den Erfahrungen von RÖSCH (4) schon bei Moorkurzversuchen infolge von Narkose die Ausfälle nicht gering waren, so wäre erst recht ein Baden in Narkose in Langversuchen wenig aussichtsreich gewesen. Die Narkose musste unterbleiben, auf der anderen Seite aber sollten die Tiere in Ruhe gebadet werden,

um nicht durch veränderte Stoffwechselbedingungen infolge erhöhter Muskeltätigkeit ungenaue Werte zu liefern. Die Vermeidung der kreislaufbelastenden und nachteiligen Evipar-Narkose bei gleichzeitigem Moorbad und das Baden der Tiere in Ruhe war möglich in selbstkonstruiertem Badekäfig aus Drahtgitter (Abb.1-3), in dem jedes Tier gesondert in einer abgeteilten Kabine gebadet wurde, wobei ausserdem seine Bewegungsfähigkeit auf das Minimalste eingeschränkt war. Vorherige Befürchtungen über besondere Unruhe der Tiere während des so in Aussicht genommenen Bades erwiesen sich als vollkommen unbegründet, da das warme Moorbad die Tiere etwas ermüden liess. Auf diese Weise konnten sie in bester Ruhe und ohne alle Umstände gebadet werden. Die Badezeiten wurden ausserdem so gelegt, dass auch im Baderaum vollkommene Ruhe herrschte und so jede Schreckreaktion der Ratten vermieden wurde. Der Badekäfig war so konstruiert, dass die Tiere nur mit dem Kopf aus dem Moorbad hervorragten. Das Moor konnte so optimal an der immer enthaart gehaltenen Bauchhaut angreifen. Nach dem Bad wurden die nassen Ratten mit angewärmter Holzwohle getrocknet und jede Unterkühlung und Zugluft vermieden. Die Versuchsergebnisse gehen aus der Tabelle 4 hervor.



Abb. 1



Abb. 2

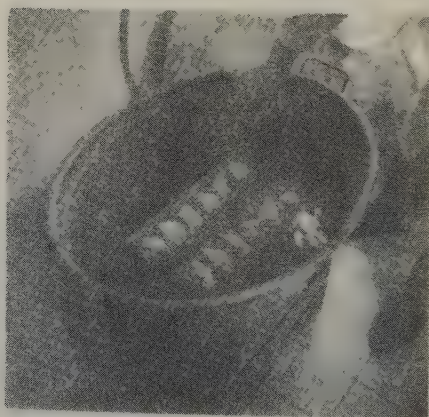


Abb. 3

v o r d e r B e h a n d l u n g						
Nummer des Tieres	Gewicht in Gramm	Fläche der Quaddeln von				Hyaluronid.- Hemmung nach einem Monat in %
		E_o	E_{m_o}	H_{m_o}	H_o	
1	135	134	139	263	262	-
		143			264	
2	170	145	146	248	253	-
		147			243	
3	165	135	132	234	230	-
		128			237	
4	160	132	138	250	254	-
		143			246	

n a c h e i n e m M o n a t:						
		B_1	E_{m_1}	H_{m_1}	H_1	
1	180	146	141	255	253	6,45
		136			257	
2	257	143	143	243	249	4,90
		142			236	
3	275	130	135	229	224	4,90
		139			234	
4	278	133	135	252	252	-1,78
		136			252	

Tabelle 4

	$\bar{x}$	s^2	Hyaluronid.- Hemmung	Sicherung
E_o	138	32,0		
H_o	248	27,2		
E_1	138	24,0		
H_1	244	35,7	3,6 %	-

Tabelle 5

2. Versuchsreihe

Moor - LANG - Versuch mit Neydhartinger Schwebstoff.

Dieser Versuch wurde an 25 Ratten durchgeführt, die von einer Zucht stammten und immer im besten Allgemeinzustand gehalten wurden. Die Tiere wurden jeden zweiten Tag über 30 Tage, also insgesamt fünfzehnmal gebadet, nachdem die Anfangsquaddelsetzung der unbehandelten Tiere erfolgt war. Die Badetechnik entsprach der in Versuchsreihe 1 erwähnten Anordnung. Nach dem letzten, dem 15. Bad wurde eine 48-stündige Pause bis zur Quaddelsetzung eingelegt. Die Versuchsergebnisse finden sich in den Tab.6 u. 8.

Nach weiteren vier Wochen, in denen keine Badebehandlung erfolgte, wurde erneut gequaddelt, um den anhaltenden Mooreffekt zu kontrollieren. Diese Ergebnisse sind ersichtlich aus den Tabellen 7 und 8.

3. Versuchsreihe

Die Ratten der Versuchsreihe 2 wurden drei Tage nach der letzten Quaddelsetzung in drei Gruppen zu je acht Tieren aufgeteilt; jede Gruppe erhielt ein verschiedenes, bzw. gar kein Mittel, um eine Vergleichsmöglichkeit zu haben.

1. Gruppe

Die acht Tiere dieser Gruppe erhielten kein Mittel. Die Quaddelsetzung und anschließende Auswertung ergab noch eine erhebliche, statistisch fassbare Hyaluronidasehemmung.

Die Werte gehen hervor aus den Tabellen 9 und 10.

2. Gruppe

Diese Ratten erhielten auf 100 Gramm ihres Körpergewichtes 0,5 mg Ergotamintartrat subcutan. Die Quaddelsetzung erfolgte 30 Minuten nach der Ergotamintartratinjektion. Die Werte stehen in den Tabellen 12, 13, 14.

3. Gruppe

In dieser Gruppe wurde pro Tier 1,5 mg Protaminsulfat intravenös injiziert und die Quaddelsetzung sofort angeschlossen. Die Versuchsergebnisse zeigen die Tabellen 15,16,17.

v o r d e r B e h a n d l u n g

Nummer des Tieres	Gewicht in Gramm	Fläche der Quaddeln in qmm von			
		E _o	E _{m_o}	H _{m_o}	H _o
1	144	130	125	240	243
		120			236
2	142	129	127	243	245
		124			240
3	138	140	138	255	255
		135			254
4	145	134	131	254	256
		127			252
5	150	131	131	253	250
		130			256
6	155	140	136	283	290
		132			276
7	150	142	137	251	242
		132			259
8	145	140	140	262	258
		140			265
9	158	144	139	255	260
		134			249
10	155	149	144	250	251
		139			248
11	145	133	127	245	236
		120			253
12	147	132	131	249	254
		129			243

Tabelle 6 (1. Teil)

13	155	129	132	257	259
		135			254
14	160	131	129	249	245
		127			252
15	150	149	144	256	248
		139			263
16	160	135	136	252	243
		136			260
17	148	125	132	254	259
		139			248
18	140	126	127	240	234
		128			245
19	154	120	117	228	226
		114			230
20	150	120	121	231	234
		121			227
21	145	120	124	254	259
		127			248
22	147	120	122	249	250
		123			248
23	145	118	121	242	249
		123			235
24	145	124	124	248	246
		124			249
25	148	144	141	252	258
		137			245

Tabelle 6 (2.Teil)

nach dem ersten Monat

Nummer des Tieres	Gewicht in Gramm	Fläche der Quaddeln in qmm von				Hyaluronid. Hemmung nach 1. Monat in %
		E ₁	E _{m1}	H _{m1}	H ₁	
1	288	144	141	157	153	72,17
		137			160	
2	240	139	135	185	191	50,00
		131			179	
3	158	129	133	186	188	58,98
		137			183	
4	242	124	130	196	190	47,16
		136			202	
5	197	142	136	180	184	59,83
		130			176	
6	208	130	135	190	191	63,27
		139			189	
7	215	133	131	183	180	59,65
		128			186	
8	215	136	143	179	179	68,03
		150			---	
9	245	126	132	193	186	53,45
		137			200	
10	222	125	132	168	170	77,36
		139			166	
11	202	116	121	156	157	75,43
		126			155	
12	245	132	132	162	166	73,73
		---			157	

Tabelle 6 (3. Teil)

n a c h d e m e r s t e n M o n a t (F o r t s .)

Nummer	Gewicht	E ₁	E _{m1}	H _{m1}	H ₁	Hyal.Hemmung
13	232	132	133	183	184	59,20
		134			182	
14	220	135	133	195	190	45,00
		130			200	
15	172	140	144	205	198	45,54
		148			211	
16	260	138	132	167	160	73,28
		125			174	
17	182	124	126	170	174	68,85
		128			166	
18	185	126	127	154	160	76,11
		128			148	
19	262	120	119	182	175	41,45
		118			189	
20	260	120	125	161	166	63,64
		130			156	
21	225	122	126	186	185	52,31
		130			187	
22	264	126	123	193	199	44,09
		120			187	
23	234	129	125	190	190	42,98
		120			190	
24	195	123	122	163	160	68,55
		120			166	
25	190	136	137	182	186	63,06
		138			177	

Tabelle 6 (Schluss)

nach dem zweiten Monat

Nummer des Tieres	Gewicht in Gramm	Fläche der Quaddeln in qmm von				Hyaluronid. Hemmung nach 2.Mon. in %
		E ₂	E _{m2}	H _{m2}	H ₂	
1	357	131	130	178	176	53,91
		129			180	
2	316	132	136	187	185	48,28
		140			189	
3	200	136	136	211	215	37,61
		---			207	
4	280	128	129	204	208	40,65
		129			200	
5	290	150	143	193	195	49,18
		136			190	
6	265	134	132	191	196	62,58
		130			186	
7	305	124	130	192	186	51,75
		136			198	
8	270	131	138	190	194	59,02
		144			186	
9	306	140	141	196	190	50,86
		141			201	
10	265	125	128	179	174	66,99
		131			184	
11	260	120	120	166	170	66,95
		119			162	
12	312	124	125	171	174	66,10
		126			168	

Tabelle 7 (1. Teil)

n a c h d e m z w e i t e n M o n a t (F o r t s .)

Nummer	Gewicht	E ₂	E _{m2}	H _{m2}	H ₂	Hyal.Hemmer
13	278	140	139	210	205	37,60
		137			215	
14	305	128	127	197	203	43,33
		125			190	
15	275	139	138	211	204	40,18
		137			218	
16	330	129	133	183	177	59,49
		137			189	
17	260	131	131	173	176	66,39
		131			170	
18	240	130	128	164	169	67,25
		126			159	
19	320	120	120	187	194	36,94
		121			180	
20	325	122	124	187	182	40,00
		126			191	
21	270	125	128	200	196	41,54
		130			204	
22	340	120	124	203	209	36,23
		128			197	
23	303	120	124	192	197	41,33
		128			186	
24	225	125	128	194	200	43,55
		130			188	
25	255	139	137	190	194	55,85
		135			186	

Tabelle 7 (2.Teil)

	$\bar{x}$	s^2	$s_{\bar{x}}$	Hyaluronid. Hemmung in %	Sicherung in %
E_0	131	24,9	3,5		
H_0	248	50,0	5,0		
E_1	130	37,6	4,3		
H_1	178	43,7	4,7	59,4	1,0
E_2	131	19,8	3,1		
H_2	190	47,0	4,8	49,6	1,0

Tabelle 8

v o r d e r B e h a n d l u n g

Nummer des Tieres	Gewicht in Gramm	Fläche der Quaddeln in qmm von			
		E _o	E _{m_o}	H _{m_o}	H _o
4	145	134	131	254	256
		127			252
8	145	140	140	262	258
		140			265
11	145	133	127	245	236
		120			253
12	147	132	131	249	254
		129			243
18	140	126	127	240	234
		128			245
19	154	120	117	228	226
		114			230
24	145	124	124	248	246
		124			249
25	148	144	141	252	258
		137			245

Tabelle 9

Hyal.Hemmung nach		N a c h		Ohne - Mittel		Hyal.-	
1.Monat	2.Monat	Gew.	Fläche der Quaddeln in qmm				Hemmung
in %	in %	in g	E	E _m	H _m	H	bei ohne
							Mittel
							in %
47,16	40,65	281	135 137	136	207	212 201	38,21
68,03	59,02	273	135 139	137	199	193 204	51,63
75,43	66,95	263	125 136	131	187	193 181	49,15
73,73	66,10	312	133 135	134	197	195 198	44,06
76,11	67,25	243	136 130	133	189	192 186	45,13
41,45	36,94	322	120 128	124	199	199 198	26,12
68,55	43,55	226	128 128	128	199	205 192	39,54
63,06	55,85	258	141 137	139	193	196 190	53,15

Tabelle 10

	$\bar{x}$	s^2	$s_{\bar{x}}$	Hyaluronidase- hemmung in %	Sicherheit in %
E_0	130	19,7	3,1		
H_0	246	49,4	5,0		
E_1	128	36,4	4,3		
H_1	172	48,9	4,9	63,6	1,0
E_2	128	14,6	2,7		
H_2	183	45,7	4,7	54,2	1,0
E	133	16,2	2,8		
H	195	39,9	4,4	43,4	1,0

Tabelle 11

v o r der Behandlung

Nummer des Tieres	Gewicht in Gramm	Fläche der Quaddeln in qmm von			
		E_o	E_{m_o}	H_{m_o}	H_o
3	138	140	138	255	255
		135			254
5	150	131	131	253	250
		130			256
7	150	142	137	251	242
		132			259
10	155	149	144	250	251
		139			248
13	155	129	132	257	259
		135			254
15	150	149	144	256	248
		139			263
17	148	125	132	254	259
		139			248
21	145	120	124	254	259
		127			248

Tabelle 12

Nr.	Hyal.Hemmung nach		Nach Ergotamintartratinjektion				Hyal.- Hemmung nach Erg.-Inj in %	
	1.Monat	2.Monat	Gew. in g	Fläche d.Quaddeln in qmm				
	in %	in %		E	E _m	H _m		H
3	58,98	37,61	205	144	145	265	259	- 8,54
				146			270	
5	59,83	49,18	292	140	135	264	268	- 8,87
				130			260	
7	59,65	51,75	268	134	135	261	253	- 8,77
				135			269	
10	77,36	66,99	269	147	146	253	249	- 2,83
				144			256	
13	59,20	37,60	280	133	135	248	243	7,20
				137			253	
15	45,54	40,18	278	145	139	265	262	- 8,03
				133			267	
17	68,85	66,39	260	138	137	266	259	- 9,83
				135			273	
21	52,31	41,54	273	130	133	264	267	- 7,60
				136			261	

Tabelle 13

	$\bar{x}$	s^2	$s_{\bar{x}}$	Hyaluronidase- hemmung in %	Sicherung in %
E_0	135	37,9	4,3		
H_0	253	51,6	5,1		
E_1	132	36,1	4,2		
H_1	183	23,9	3,4	59,8	1,0
E_2	134	26,9	3,7		
H_2	196	44,4	4,7	48,3	1,0
E	138	20,0	3,2		
H	261	52,9	5,1	6,1	-

Tabelle 14

v o r d e r B e h a n d l u n g

Nummer des Tieres	Gewicht in Gramm	Fläche der Quaddeln in qmm von			
		E_o	E_{m_o}	H_{m_o}	H_o
1	144	130	125	240	243
		120			236
2	142	129	127	243	245
		124			240
9	158	144	139	255	260
		134			249
14	160	131	129	249	245
		127			252
16	160	135	136	252	243
		136			260
20	150	120	121	231	234
		121			227
22	147	120	122	249	250
		123			248
23	145	118	121	242	249
		123			235

Tabelle 15

Nr.	Hyal.Hemmung nach		Nach Protaminsulfatinjektion				Hyal.- Hemmung. nach Prot.Jnd. in %	
	1.Monat in %	2.Monat in %	Gew. in g	Fläche der Quaddeln/qmm				
				E	E _m	H _m	H	
1	72,17	53,91	360	135	134	246	253	- 5,21
				132			238	
2	50,00	48,28	315	132	132	253	257	- 8,62
				131			248	
9	53,45	50,86	310	137	144	263	273	- 6,89
				151			253	
14	45,00	43,33	309	131	133	238	245	9,16
				135			230	
16	73,28	59,49	330	136	137	264	266	- 10,08
				138			262	
20	63,64	40,00	327	129	130	240	231	- 8,18
				130			250	
22	44,09	36,23	345	125	130	258	264	- 7,08
				135			252	
23	42,98	41,33	306	125	123	230	222	9,91
				120			238	

Tabelle 16

	$\bar{x}$	s^2	$s_{\bar{x}}$	Hyaluronidase- hemmung in %	Sicherung in %
E ₀	127	17,2	2,9		
H ₀	245	48,9	4,9		
E ₁	130	40,2	4,5		
H ₁	180	58,1	5,4	56,4	1,0
E ₂	130	17,9	3,0		
H ₂	190	50,7	5,0	47,6	1,0
E	133	22,0	3,3		
H	249	94,0	6,8	3,9	-

Tabelle 17

4. Versuchsreihe

Leer-Tier-Versuch. Um eine Vergleichsmöglichkeit zwischen behandelten und nicht behandelten Ratten zu haben, erhielten die Tiere dieser Reihe keinerlei Mittel; die Ernährung war dieselbe wie bei den behandelten.

Die Ergebnisse dieser Reihe gehen hervor aus den Tabellen 18, 19, 20, 21.

zu B e g i n n des Versuches - o h n e Behandlung

Nummer des Tieres	Gewicht in Gramm	Fläche der Quaddeln in qmm von			
		E _o	E _{m_o}	H _{m_o}	H _o
1	132	131			256
		139	135	258	260
2	140	126			243
		128	127	239	234
3	138	138			246
		130	134	244	242
4	150	131			258
		140	136	261	263
5	148	125			231
		133	129	227	222
6	152	127			235
		130	129	232	229
7	160	139			254
		136	138	253	252
8	149	124			220
		119	122	224	228
9	142	143			245
		139	141	243	240
10	125	156			258
		158	157	261	264
11	145	157			267
		148	153	268	268
12	153	120			220
		127	124	220	---
13	135	140			253
		138	139	252	250

nach dem ersten Monat - ohne Behandlung

Nummer des Tieres	Gewicht in Gramm	Fläche der Quaddeln in qmm von				Hyal.- Hemmung nach I.M. in %
		E ₁	E _{m1}	H _{m1}	H ₁	
1	182	145	140	256	261	1,67
		135			251	
2	252	136	131	245	247	-5,35
		125			243	
3	205	135	131	249	253	-4,50
		127			245	
4	242	138	134	252	250	7,20
		130			253	
5	206	130	130	231	227	-4,08
		130			235	
6	227	128	133	240	236	-7,77
		138			244	
7	245	138	138	244	249	7,83
		---			239	
8	210	128	129	232	228	-7,84
		130			235	
9	188	136	135	239	237	6,67
		133			241	
10	235	149	149	263	260	-1,92
		148			266	
11	235	146	147	257	254	9,56
		147			259	
12	222	122	126	211	213	9,31
		129			208	
13	177	132	131	259	250	-6,20
		130			268	

Tabelle 19

nach dem zweiten Monat - ohne Behandlung

Nummer des Tieres	Gewicht in Gramm	Fläche der Quaddeln in qmm von				Hyal.- Hemmung nach 2. Mt. in %
		E ₂	E _{m2}	H _{m2}	H ₂	
1	240	150	142	256	260	1,67
		133			251	
2	325	140	140	247	251	-7,14
		---			243	
3	245	137	136	237	240	6,40
		134			233	
4	328	140	138	253	255	6,40
		135			251	
5	258	133	131	235	230	-8,16
		129			239	
6	305	134	132	232	236	0,00
		130			227	
7	332	146	142	247	243	5,22
		137			250	
8	240	128	126	226	231	-1,96
		123			221	
9	230	140	142	240	239	5,71
		144			241	
10	285	146	142	260	262	0,96
		138			258	
11	263	153	153	266	270	1,74
		152			261	
12	260	127	128	225	220	-5,20
		128			229	
13	250	135	137	249	254	2,65
		139			244	

Tabelle 20

	N	$\bar{x}$	s^2	$s_{\bar{x}}$
E_0	12	136	18,4	1,24
H_0	12	247	16,4	1,17
E_1	12	135	19,8	1,28
H_1	12	247	36,1	1,73
E_2	12	137	29,2	1,56
H_2	12	245	30,1	1,58

Tabelle 21

Abkürzungen in den Tabellen 4 - 21

- E_0 - Evansblaufarbstoffwert der unbehandelten Tiere vor der Medikation
 E_{m_0} - Mittelwert (= m) von E_0
 H_0 - Farbstoff-plus-Hyaluronidasewert vor der Medikation
 H_{m_0} - Mittelwert von H_0
 E_1 - Evansblaufarbstoffwert der behandelten Tiere nach 1. Monat
 E_{m_1} - Mittelwert von E_1
 H_1 - Farbstoff-plus-Hyaluronidasewert der behandelten Tiere nach dem 1. Monat
 H_{m_1} - Mittelwert von H_1
 E_2 - Farbstoffwert nach dem 2. Monat
 E_{m_2} - Mittelwert von E_2
 H_2 - Farbstoff-plus-Hyaluronidasewert nach dem 2. Monat
 H_{m_2} - Mittelwert von H_2
 E - Evansblau-Farbstoffwert
 E_m - Mittelwert von E
 H - Farbstoff-plus-Hyaluronidasewert
 H_m - Mittelwert von H

BERECHNUNGEN und STATISTIK

Vor Beginn der Versuche sowie an den Zeitpunkten, zu denen die Hyaluronidasehemmung bestimmt werden sollte, wurden jedem Versuchstier je zwei reine Farbstoff-Quaddeln und zwei Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeln gesetzt. Zehn Minuten nach dem Setzen wurde die Fläche dieser Quaddeln in Quadratmillimeter bestimmt. Diese Masszahl diente zur Charakterisierung der Diffusionsgeschwindigkeit des Farbstoffs, bzw. des Farbstoff-Hyaluronidase-Gemisches. Die Messwerte eines zusammengehörigen Paares von Quaddeln wurden als eine Doppelbestimmung aufgefasst, und deren Abweichung als eine Schätzung des experimentellen Fehlers angesehen. Dieser Fehler ist allerdings nicht allein durch die experimentelle Technik bedingt, vielmehr muss angenommen werden, dass er auch eine biologische Komponente enthält. Notwendigerweise müssen die beiden zusammengehörigen Quaddeln an verschiedenen Stellen der Bauchhaut gesetzt werden, und es darf angenommen werden, dass die Permeabilität der Bauchhaut an verschiedenen Stellen leichte Unterschiede aufweist. Diese Unterschiede in der Permeabilität der Bauchhaut machen sich natürlich in der Diffusionsgeschwindigkeit der Quaddeln bemerkbar. Trotzdem behalten wir für diese Abweichung zwischen zwei Doppelbestimmungen die Bezeichnung "experimenteller Fehler" bei, da wir später in Zusammenhang mit der statistischen Auswertung noch auf eine besondere Art von Fehler, nämlich den "biologischen Fehler" zu sprechen kommen.

Bei der prozentualen Berechnung wurde davon ausgegangen, dass eine Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel vor Applikation des hyaluronidasehemmenden Stoffes einer nullprozentigen Hemmung entspricht. Dagegen bedeutet die reine Farbstoff-Quaddel eine hundertprozentige Hyaluronidasehemmung, da eine Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel mit vollständig gehemmter Hyaluronidase-Aktivität die gleichen Ausbreitungsverhältnisse aufweisen würde. Unter Verwendung dieser beiden Festpunkte wurde die prozentuale Hemmung aus der Ausbreitung der Farbstoff-Hyaluronidasequaddel nach den Moorbädern errechnet.

Moorversuche

Die statistische Auswertung erfolgte in jedem Falle auf Grund eines linearen statistischen Modelles. Hierbei wird angenommen, dass die Grösse etwaiger Änderungen der Quaddeln von einem Zeitpunkt zum anderen nur von dem Zeitpunkt, jedoch nicht von den Versuchstieren abhängt. Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass alle Tiere sich um einen konstanten, vom Versuchstier unabhängigen Wert hinsichtlich der Grösse ihrer Quaddeln unterscheiden. Dies wurde gleichmässig für die Farbstoff-Quaddeln als auch für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeln angenommen. Entsprechend dem statistischen Modell erfolgte die Auswertung jeweils durch Varianzanalysen, und zwar getrennt für die reinen Farbstoff-Quaddeln und für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeln. Das Ergebnis dieser Varianzanalysen findet sich in den Tabellen 22-26. Zu den Ergebnissen dieser Varianzanalysen ist generell folgendes zu bemerken. Die "Varianz innerhalb der Doppelbestimmung" ist ein Schätzwert des experimentellen Fehlers, der aus den Doppelbestimmungen gewonnen wurde. Die Wechselwirkung "Tiere-Zeiten" drückt aus, in welcher Weise die tatsächlich gemessenen Werte von den Erwartungswerten des statistischen Modelles abweichen, d.h. sie drückt aus, in welcher Weise die Unterschiede, die die Quaddeln von einem Zeitpunkt zum anderen aufweisen, von den jeweiligen Versuchstieren bedingt sind. Sie stellt somit in gewisser Hinsicht ein Mass für die Unterschiede in der Reaktion der Tiere dar, die durch die verschiedene biologische Variabilität der Tiere bedingt sind. Man kann sie somit als eine Schätzung des biologischen Versuchsfehlers ansehen. Es ist nun bemerkenswert, dass bei den vorliegenden Versuchen dieser biologische Versuchsfehler bei keiner Versuchsreihe wesentlich grösser als der experimentelle Fehler ist. Ob es sich hierbei um einen zufälligen Effekt handelt, der etwa dadurch erreicht wurde, dass die Tiere einen homogenen Tierstamm bilden, oder ob es die Folge besonders exakter Versuchsdurchführung ist, kann nicht ohne weiteres entschieden werden. Der für die Beurteilung des Unterschiedes zwischen dem experimentellen Fehler und dem biologischen Fehler massgebende Varianzquotient F_{emp} findet sich in den jeweiligen Tabellen der Varianzanalysen.

Die Überschreitungswahrscheinlichkeit dieses Varianzquotienten ist in keinem Falle kleiner als 5 %, d.h. die statistische Analyse liefert keinerlei Anhaltspunkte dafür, dass die fraglichen Varianzen verschieden sind. Als Fehlervarianz bei den statistischen Prüfungen zogen wir allerdings nicht den experimentellen Fehler, d.h. die "Varianz zwischen den Doppelbestimmungen" heran, da die Unterschiede in der Reaktion der Tiere sicher nicht allein durch experimentelle Fehler bedingt sind. Um der biologischen Variabilität der Tiere Rechnung zu tragen, wurde daher die Wechselwirkung "Tiere-Zeiten" den statistischen Prüfungen als Versuchsfehler zugrunde gelegt.

Im einzelnen ist das Ergebnis der Varianzanalysen wie folgt zu interpretieren.

Versuchsreihe 1

Diesem Versuch lag die biologische Hypothese zugrunde, dass durch ein einmaliges Moorbad keinerlei Einfluss auf die Ausbreitung der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel ausgeübt wird. Dementsprechend prüften wir mittels einer Varianzanalyse, deren Ergebnis sich in Tabelle 27 findet, ob es zulässig ist anzunehmen, dass sich die beiden Quaddeltypen, nämlich die reine Farbstoffquaddel und die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel, während des gesamten Versuchsablaufes nur um eine konstante, vom Zeitpunkt der Bestimmung unabhängige Grösse unterscheiden. Die zur Prüfung dieser Hypothese massgebliche Wechselwirkung "Zeiten-Quaddeln", ist wesentlich kleiner als die Varianz innerhalb der Doppelbestimmung, d.h. die statistischen Untersuchungen geben keinerlei Veranlassung, die aufgestellte Hypothese zu verwerfen. Die "Varianz zwischen den Zeiten" ist ebenfalls nicht wesentlich grösser als die "Varianz zwischen den Doppelbestimmungen", d.h. ein wesentlicher Einfluss des Zeitpunktes der Bestimmung auf die Grösse der beiden Quaddeltypen ist ebenfalls nicht feststellbar. Insgesamt besagen diese beiden Ergebnisse, dass ein Einfluss des Moor-Kurz-Bades auf die Ausbreitung einer der beiden Quaddeltypen statistisch nicht nachweisbar ist, und dass die beiden Quaddeltypen vollkommen gleichartig reagieren.

Versuchsreihe 2

Bei der reinen Farbstoff-Quaddel ist die Varianz "Zwischen den Zeiten" zahlenmässig wesentlich kleiner als die Wechselwirkung "Tiere-Zeiten". Die statistische Analyse ergibt somit keinerlei Hinweise dafür, dass die reine Farbstoff-Quaddel im Verlaufe des Versuches eine Änderung erfährt. Bei der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel dagegen besitzt der Varianzquotient $F_{\text{emp.}}$ zwischen der "Varianz zwischen den Zeiten" und der Wechselwirkung "Tiere-Zeiten" eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die wesentlich kleiner als 0,1 % ist. Es kann somit als statistisch hoch gesichert gelten, dass die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel sich im Verlauf der Versuche wesentlich ändert. Diese Ergebnisse lassen sich dahingehend interpretieren, dass Moorbäder bei längerer Anwendung auf die Ausbreitung der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeln einen wesentlichen Einfluss ausüben, während sie die Ausbreitung der reinen Farbstoff-Quaddeln praktisch nicht beeinflussen.

Versuchsreihe 3

Um zu einer zuverlässigen Beurteilung der Zusatzversuche zu gelangen, ist es notwendig, die nunmehr gebildeten drei Tiergruppen daraufhin zu untersuchen, ob ihr Verhalten während des Langzeitversuches als gleichartig angesehen werden kann. Hierzu führten wir Varianzanalysen durch, bei denen wir die drei Tiergruppen hinsichtlich des Verhaltens der Farbstoff-Quaddeln und der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeln während des Moorlangzeitversuches verglichen. Es musste dabei geprüft werden, ob sich die einzelnen Tiergruppen zu den einzelnen Zeiten des Versuches in ihrem Verhalten unterscheiden, d.h. es war zu prüfen, ob eine "signifikante" Wechselwirkung "Tiergruppe-Zeiten" besteht. Die zu einem bestimmten Zeitpunkt des Versuches bestimmten Werte der Grösse der Quaddeln aller Tiere einer Tiergruppe fassten wir hierzu als einen Versuchsblock auf. Das Ergebnis der Varianzanalysen findet sich in der Tabelle 23 und ist folgendermassen zu interpretieren: Der Varianzquotient $F_{\text{emp.}}$ zwischen der Wechselwirkung "Tiergruppen-Zeiten" und der "Varianz innerhalb der

Doppelbestimmungen" (experimenteller Fehler) besitzt weder für die reine Farbstoff-Quaddel noch für die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die kleiner als 5 % ist. Die statistische Analyse gibt somit keinen Hinweis dafür, dass sich die drei Tiergruppen während des Moorlangzeitversuches hinsichtlich ihres Verhaltens wesentlich unterscheiden. Lediglich die absolute Grösse der Quaddeln ist bei den einzelnen Tiergruppen verschieden, was in der Grösse der "Varianz zwischen den Tiergruppen" zum Ausdruck kommt. Die absolute Grösse der Quaddeln hat jedoch, wie unsere bisherigen Erfahrungen gezeigt, auf den Mechanismus der Hyaluronidasehemmung keinen wesentlichen Einfluss, sodass es berechtigt ist anzunehmen, dass die drei Tiergruppen nach Abschluss des Moorlangzeitversuches im wesentlichen die gleiche Ausgangssituation besitzen. Etwaige Unterschiede in den Zusatzversuchen können daher nicht auf Unterschiede zurückgeführt werden, die zwischen den Tiergruppen nach Beendigung der Moorlangzeitversuche vorgelegen haben.

Die statistische Auswertung der Zusatzversuche selber erfolgte wieder mittels Varianzanalysen in der Form, wie sie auch bei den Moorlangzeitversuchen zur Anwendung gelangten. Das Ergebnis dieser Varianzanalysen findet sich in den Tabellen 24 mit 26. Im einzelnen sind diese Ergebnisse wie folgt zu deuten. Bei dem Zusatzversuch 2 (Ergotamintartrat) besitzt bei der reinen Farbstoff-Quaddel der Varianzquotient $F_{\text{emp.}}$ zwischen der "Varianz zwischen den Zeiten" und der Wechselwirkung "Tiere-Zeiten" eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die wesentlich grösser als 5 % ist. Bei diesem Zusatzversuch lässt sich somit statistisch kein Einfluss der Medikation auf die reine Farbstoff-Quaddel nachweisen. Etwas anders ist die Situation bei den Zusatzversuchen 1 (keine Medikation) und 3 (Protaminsulfat). Hier besitzt der entsprechende Varianzquotient eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die in beiden Fällen etwas kleiner als 5 % ist. Bei diesen Versuchsreihen lassen sich somit schwach gesicherte Schwankungen in der Grösse der Farbstoff-Quaddeln im Verlaufe des Versuches feststellen. Bei der Kleinheit des Effektes und der schwachen statistischen Sicherung, die hierfür vorliegt, darf jedoch kaum angenommen werden, dass es sich hierbei um eine Wirkung der Medikation handelt. Vielmehr darf vermutet

werden, dass die Grösse der reinen Farbstoff-Quaddel gewissen biologischen Schwankungen unterworfen ist, und dass im vorliegenden Falle diese Schwankungen rein zufällig bei der statistischen Auswertung erfasst wurden. Diese Interpretation der Ergebnisse ist selbstverständlich nicht statistischer Natur, sie wird jedoch durch ähnliche Ergebnisse bei anderen Versuchsreihen erhärtet, bei denen die Wechselwirkung "Tiere-Zeiten" wesentlich grösser war als bei den vorliegenden Versuchen, sodass kleine Effekte, wie sie hier vorliegen, nicht erfasst werden konnten.

Bei der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel besitzt bei allen drei Zusatzversuchen der Varianzquotient zwischen der "Varianz zwischen den Zeiten" und der Wechselwirkung "Tiere-Zeiten" eine Überschreitungswahrscheinlichkeit, die wesentlich kleiner als 0,1 % ist. Dies war auch nicht anders zu erwarten, da wir bei der Auswertung der Zusatzversuche auch das Verhalten der jeweiligen Tiergruppe während des Moorlangzeitversuches berücksichtigten. Inwieweit zwischen den Tiergruppen Unterschiede nach Ausführung des Zusatzversuches auftreten, wird sich ergeben, sobald untersucht wird, zwischen welchen Zeitpunkten des Versuches speziell Unterschiede bestehen.

Die Varianzanalysen machen nur eine Aussage darüber, ob generell zwischen den Grössen der zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmten Quaddeln Unterschiede bestehen. Zur Entscheidung der Frage, zwischen welchen Zeitpunkten diese Unterschiede auftreten, wandte wir im Anschluss an die Varianzanalysen den Test nach DUNCAN zur simultanen Prüfung mehrerer Mittelwertsdifferenzen an. Das Ergebnis dieses Testes findet sich in den Tabellen 8, 14, 27 in der Spalte "Sicherheit". Hier ist die Irrtumswahrscheinlichkeit angegeben, mit der behauptet werden kann, dass die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel zu dem betreffenden Zeitpunkt wesentlich kleiner ist als die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel vor Beginn der Bäder. Die Grösse dieser Unterschiede ergibt sich aus der Differenz der Mittelwerte $\bar{x}$ aller zu dem jeweiligen Zeitpunkt bestimmter Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeln. Auf Grund unseres linearen statistischen Modelles, dessen Berechnung sich aus den Varianzanalysen ergab, stellen diese

Mittelwertsdifferenzen in erster Näherung die Grösse der Änderungen der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel jedes einzelnen Tieres von einem Zeitpunkt zum anderen dar. In den Tabellen ist ausserdem die Grösse der in üblicher Weise berechneten, prozentualen Hyaluronidasehemmung für jeden Zeitpunkt angegeben.

Aus der Grösse der Mittelwertsdifferenzen ergibt sich für die Zusatzversuche, dass nach Gabe von Ergotamintartrat, bzw. Protaminsulfat die vorher noch vorhandene Hyaluronidasehemmung nicht mehr weiter besteht. Dagegen tritt ohne Medikation keinerlei Änderung der Hyaluronidasehemmung zu diesem Zeitpunkt auf.

In den Tabellen 5, 8, 11, 14, 17 ist ausserdem noch die Varianz s^2 zwischen den zum jeweiligen Zeitpunkt vorgenommenen Doppelbestimmungen angegeben, sowie der mittlere Fehler $s_{\bar{x}}$ des Mittelwertes aus einer Doppelbestimmung. Die Grösse dieses mittleren Fehlers zeigt, dass die experimentelle Technik erstaunlich genau gehandhabt werden kann.

Farbstoff-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	23	5,411	235	7,34	9,1 %
Zwischen den Zeiten	2	2	1	-	-
Tiere - Zeiten	46	1,418	32	-	-
Zwischen d.Doppelbest.	71	6,831	96		
Innerhalb d.Doppelb.	72	1,976	27		
Gesamt - Varianz	143	8,807	62		

Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	23	14,189	617	4,37	0,1 %
Zwischen den Zeiten	2	135,295	67,647	100,00	0,1 %
Tiere - Zeiten	46	6,469	141	-	-
Zwischen d.Doppelbest.	71	155,953	2,197		
Innerhalb d.Doppelb.	72	3,371	47		
Gesamt - Varianz	143	159,324	1,114		

Tabelle 22
Moor-Lang-Versuch

Farbstoff-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen d. Tiergrupp.	2	852	426	15,21	0,1 %
Zwischen d. Zeiten	2	2	1	-	-
Tiergruppe - Zeiten	4	168	42	1,55	-
Zwischen den Blöcken	8	1,022	128		
Innerhalb d. Blöcke	63	5,809	92	3,29	0,1 %
Zwischen Doppelbest.	71	6,831	96		
Innerh. Doppelbest.	72	1,976	27		
Gesamt - Varianz	143	8,807	62		

Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen d. Tiergrupp.	2	2,339	1,169	22,92	0,1 %
Zwischen den Zeiten	2	135,295	67,647	100,00	0,1 %
Tiergruppe - Zeiten	4	531	133	2,82	-
Zwischen den Blöcken	8	138,165	17,271		
Innerhalb der Blöcke	63	17,788	282	5,53	0,1 %
Zwischen Doppelbest.	71	155,953	2,197		
Innerhalb Doppelbest.	72	3,371	47		
Gesamt - Varianz	143	159,324	1,114		

Tabelle 23

Vergleich der Ausgangslagen

Farbstoff - Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	7	1,047	149	3,46	5 %
Zwischen den Zeiten	3	242	80	2,29	-
Tiere - Zeiten	21	905	43		
Zwischen d. Doppelbest.	31	2,194	71		
Innerhalb d. Doppelbest.	32	967	30		
Gesamt - Varianz	63	3,161	50		

Farbstoff - Hyaluronidase - Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	7	2,659	379	2,76	5 %
Zwischen den Zeiten	3	75,076	25,025	100,00	0,1 %
Tiere - Zeiten	21	2,873	137		
Zwischen den Doppelbest.	31	80,508	2,597		
Innerhalb d. Doppelbest.	32	1,383	43		
Gesamt - Varianz	63	81,891	1,300		

Tabelle 24

Ergotamintartratversuch

Farbstoff - Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	7	1,696	242	8,96	0,1 %
Zwischen den Zeiten	3	241	80	3,08	5 %
Tiere - Zeiten	21	569	27		
Zwischen d. Doppelbest.	31	2,506	81		
Innerhalb d. Doppelbest.	32	780	24		
Gesamt - Varianz	63	3,296	52		

Farbstoff - Hyaluronidase - Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	7	3,950	564	3,18	5 %
Zwischen den Zeiten	3	66,290	20,763	100,00	0,1 %
Tiere - Zeiten	21	3,707	177		
Zwischen d. Doppelbest.	31	69,947	2,256		
Innerhalb d. Doppelbest.	32	2,013	63		
Gesamt - Varianz	63	71,960	1,142		

Tabelle 25
Protaminsulfatversuch

Farbstoff - Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	7	2,498	357	23,80	0,1 %
Zwischen den Zeiten	3	232	77	3,50	5,0 %
Tiere - Zeiten	21	308	15	-	-
Zwischen d. Doppelbest.	31	3,038	98		
Innerhalb d. Doppelbest.	32	695	22		
Gesamt - Varianz	63	3,733	59		

Farbstoff - Hyaluronidase - Quaddel

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	7	5,282	754	5,38	1 %
Zwischen den Zeiten	3	52,164	17,388	100,00	0,1 %
Tiere - Zeiten	21	2,934	140		
Zwischen d. Doppelbest.	31	60,380	1,948		
Innerhalb d. Doppelbest.	32	1,471	46		
Gesamt - Varianz	63	61,851	981		

Tabelle 26

Ohne-Präparat-Versuch

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	F _{emp.}	p
Zwischen den Tieren	3	1,287	429	14,30	0,1 %
Zwischen den Zeiten	1	36	36	1,20	-
Zwischen-Quaddeln-Typen	1	93,961	93,961	100,00	0,1 %
Tiere - Zeiten	3	21	7	-	-
Tiere - Quaddeln	3	639	213	7,10	0,1 %
Zeiten - Quaddeln	1	28	28	-	-
Rest - Varianz	3	70	23		
Zwischen d. Doppelbest.	15	96,042	6,403		
Innerhalb d. Doppelbest.	16	474	30		
Gesamt - Varianz	31	96,516	3,113		

Tabelle 27
Moorkurzversuche

Unbehandelte Tiere

Ziel der statistischen Analyse war es zu prüfen, ob die Ausbreitung beider Quaddeltypen über den gesamten Zeitraum des Versuches hinweg als konstant angesehen werden kann.

Der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse wurde ein entsprechendes lineares Modell zugrunde gelegt, wie es auch bei der Auswertung der Versuche über die Hyaluronidasehemmung bei Medikation zur Anwendung gelangte. Es war jedoch in diesem Falle nicht notwendig, die Farbstoff-Quaddel und die Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel getrennt zu behandeln, da die Prüfhypothese impliziert, dass die beiden Quaddeltypen sich vollkommen gleichartig verhalten.

Entsprechend dem zugrunde gelegten linearen Modelle erfolgte die Auswertung mittels einer mehrfachen Varianzanalyse. Die

hierbei ermittelten Varianz-Komponenten der Gesamt-Varianz, so wie die Zahl der ihnen zukommenden Freiheitsgrade sind in der Tabelle 28 in der üblichen Form zusammengestellt.

Art der Varianz	n	SAQ	MAQ	$F_{\text{emp.}}$	p
Zwischen den Tieren	11	11,420	1,038		0,1 %
Zwischen den Zeiten	2	4	2		-
Zwischen den Quaddel-Typ.	1	434,501	434,501		0,1 %
Tiere - Zeiten	22	890	40	1,60	-
Tiere-Quaddeln-Typen	11	1,499	136	5,44	0,1 %
Zeiten-Quaddeln-Typen	2	96	48	1,92	-
Rest - Varianz	22	565	26	1,00	-
Zwischen d. Doppelbest.	71	448,975	6,324		
Innerhalb d. Doppelbest.	72	1,802	25		
Gesamt - Varianz	143	450,777	3,152		

Tabelle 28

Die Ergebnisse der Varianzanalyse sind wie folgt zu interpretieren.

a) Der Mittelwert von zwei zusammengehörigen Einzelbestimmungen ist mit einem mittleren Fehler behaftet, der sich aus der Varianz zwischen diesen beiden Einzelbestimmungen schätzen lässt. Eine genauere Schätzung dieses mittleren Fehlers erhält man, wenn man alle 72 Doppelbestimmungen berücksichtigt und annimmt, dass der mittlere Fehler innerhalb aller Doppelbestimmungen gleich ist. Eine unabhängig von der Varianzanalyse durchgeführte Prüfung dieser Annahme mittels des Testes von BARTLETT ergab, dass die Messergebnisse dieser Annahme nicht widersprechen. Die in der Varianzanalyse angegebene "Varianz innerhalb der Doppelbestimmungen" stellt somit die beste aus den Versuchsergebnissen zu gewinnende Schätzung der Varianz zwischen zusammengehörigen Einzelbestimmungen dar. Aus ihr ergibt sich als mittlerer

Fehler des Mittelwertes $\bar{x}$ einer Doppelbestimmung der Wert $\pm 3,5 \text{ mm}^2$. Als Vertrauensintervall von $\bar{x}$ folgt hieraus $\bar{x} \pm 7,05 \text{ mm}^2$.

b) Die Abweichung der empirischen Ergebnisse von den Hypothesen, die dem linearen Modell zugrunde liegen, drücken sich in der Varianzanalyse in den Wechselwirkungen "Tiere - Zeiten", "Tiere-Quaddeltypen" und der "Rest - Varianz" aus. Der Vergleich dieser Wechselwirkungen mit dem experimentellen Fehler (Varianz innerhalb der Doppelbestimmungen) nach dem Varianz-Quotienten-Test ergibt nur für die Wechselwirkung zwischen Tieren und Quaddeltypen einen Varianz-Quotienten $F_{\text{emp.}}$, dessen Grösse nicht mehr als zufallsbedingt angesehen werden kann. (Überschreitungswahrscheinlichkeit $p = 0,1 \%$). Die Änderungen, welche die Quaddeln von einem Bestimmungspunkt zum anderen erfahren, können somit als unabhängig vom Versuchstier und vom Typus der Quaddel angesehen werden. Dagegen ist der Unterschied zwischen den beiden Quaddeltypen wesentlich von dem jeweiligen Versuchstier abhängig; (s. unten unter d.).

c) Die mittlere Änderung, die die Grösse der Quaddeln von einem Zeitpunkt zum anderen erfährt, und die - wie oben bemerkt - von den Versuchstieren und dem Typus der Quaddeln unabhängig ist, drückt sich in der "Varianz zwischen den Zeiten" aus. Diese ist zahlenmässig wesentlich kleiner als der experimentelle Fehler, d.h. die Änderungen der Quaddelgrössen im Verlaufe des Versuches liegen vollkommen in dem Bereich des experimentellen Fehlers. Die vorliegenden Versuche berechtigen somit zu dem Schluss, dass sich im Verlaufe des Beobachtungszeitraumes die Diffusionsgeschwindigkeit weder bei der Farbstoff- noch bei der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel geändert hat.

Zur Beurteilung dieses Ergebnisses ist es vielleicht von Bedeutung zu bemerken, dass in dem gleichen Zeitraum die Tiere eine wesentliche Gewichtszunahme erfahren haben, deren Betrag im Mittel $132 \pm 5,6 \text{ g}$ betrug.

d) Die gesicherte Wechselwirkung zwischen Tieren und Quaddeltypen bringt zum Ausdruck, dass der Unterschied zwischen der Grösse der Farbstoff- und der Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddel

vom Versuchstier abhängig ist. Eine orientierende Untersuchung dieses Sachverhaltes durch Berechnung der Regression zwischen Farbstoff-Quaddeln und den Farbstoff-Hyaluronidase-Quaddeln zeigte, dass der Unterschied zwischen den beiden Quaddel-Typen annähernd linear mit der Grösse der Farbstoff-Quaddel wächst.

In Tabelle 21 ist für jeden Bestimmungszeitpunkt der Mittelwert $\bar{x}$, die Varianz s^2 zwischen zusammengehörige Einzelmessungen und der sich hieraus ergebende mittlere Fehler $s_{\bar{x}}$ des Mittelwertes einer Doppelbestimmung angegeben. Der Vergleich der Varianzen s^2 mittels des BARTLETT-Testes ergab bei $n = 5$ Freiheitsgraden einen Wert $\chi^2_{\text{emp}} = 3,035$, dem eine Überschreitungswahrscheinlichkeit von höchstens 50 % zukommt. Die Varianzen s^2 , die die Grösse des experimentellen Fehlers zum Ausdruck bringen, können daher als vom Zeitpunkt ihrer Bestimmung und vom Typus der Quaddeln unabhängig angesehen werden. (s. auch oben unter a)

DISKUSSION

Die Versuche der Versuchsreihe 1 haben gezeigt, dass vier Wochen nach einem einmaligen Moorbad eine statistisch fassbare Hyaluronidasehemmung nicht mehr vorliegt. 48 Stunden nach dem letzten Moorbad einer zweitäglichen vierwöchigen Serie einer Moorbadbehandlung wurde noch eine maximale Hyaluronidasehemmung von 59,4 % gefunden. Nach einer behandlungsfreien Zeit von weiteren 28 Tagen nach der genannten Badeserie haben wir immer noch eine kaum geringere Hyaluronidasehemmung von 49,6 % nachweisen können. Diese Versuche zeigen, dass im Anschluss an eine Moorbadserie nach einem Zeitraum von insgesamt 30 Tagen die Hyaluronidasehemmung noch fast vollständig erhalten ist, was lediglich als ein Effekt mehrerer Moorbäder angesehen werden muss, wie die Vergleiche mit der Versuchsreihe 1 eines einmaligen Moorbades zeigen. An dieser Stelle sei erwähnt, dass nach den Versuchen von FUMY (23) mit Resochin ähnliche Verhältnisse vorliegen; die Ergebnisse von SCHWANK (24), die mit Chloraethylbenzmetoxazon durchgeführt wurden, zeigen eine stärkere Abnahme der Hyaluronidasehemmung. Es war die Frage zu klären, ob diese erhebliche hyaluronidasehemmende Nachwirkung einer Moorbäderserie immer noch auf eine Katecholaminwirkung zurückzuführen ist, oder ob in diesem Stadium die Hyaluronidasehemmung als solche bereits in irgendeiner Form manifest geworden ist. Es wurden deshalb mit je acht Tieren Untersuchungen durchgeführt, die den Einfluss einer Ergotamintartratinjektion auf die Hyaluronidasehemmung feststellen sollten. Die nicht mit Ergotamintartrat behandelten Ratten zeigten drei Tage nach der letzten Bestimmung erwartungsgemäss noch die einen Monat nach dem letzten Moorbad vorhandene Hyaluronidasehemmung, während zur gleichen Zeit nach Ergotamintartratinjektion die Hemmung nicht mehr sichtbar war. Es ist nach diesen Versuchen also zur Diskussion zu stellen, ob auch im Anschluss an eine Moorbadbehandlung laufende Katecholaminausschüttungen aus dem Nebennierenmark erfolgen, die weiterhin die Hyaluronidasehemmung bedingen und in unseren Versuchen durch Ergotamintartrat

als Adrenolytikum blockiert werden. Die von MATHIES (25) und Mitarbeitern (26, 27) durchgeführten Versuche der Hyaluronidasehemmung im akuten Versuch scheinen bereits anzudeuten, dass die Katecholaminausschüttungen nicht gleichmässig erfolgen und dann langsam zurückgehen, sondern dass eine stossweise Ausschüttung erfolgt.

Die einleitend erwähnte Möglichkeit einer Mitwirkung des Heparin beim Zustandekommen der Hyaluronidasehemmung nach Moorbädern führte zu den in dieser Arbeit abschliessend durchgeführten Versuche einer Blockierung der Hyaluronidasehemmung durch Protaminsulfat. Wir konnten zeigen, dass im Gegensatz zu den nicht mit Protaminsulfat behandelten Tieren die Hyaluronidasehemmung einen Monat nach dem letzten Bad einer vierwöchigen Badeserie ebenfalls ausbleibt. Wenn wir eine Heparinwirkung im Anschluss an eine Katecholaminausschüttung als Wirkungsmechanismus der Hyaluronidasehemmung annehmen wollen, so spricht auch der Ausfall der letztgenannten Versuchsreihe für diesen Wirkungsmechanismus, der ebenfalls längere Zeit nach einer Moorbadeserie noch intakt zu sein scheint.

Die Vergleichsuntersuchungen mit völlig unbehandelten Tieren wurden durchgeführt, um zu zeigen, dass - wie erwartet - eine Hyaluronidasehemmung nicht auftritt und dass vor allem, wie in der Statistik erwähnt, die Methodik die ausreichende Sicherheit der Bestimmung gewährleistet. In dem Zeitraum der Durchführung der Versuche haben die Tiere ihr Gewicht nahezu verdoppelt, ohne dass ein Einfluss auf die Grösse der Farbstoffflecken zu erkennen gewesen wäre. Damit konnte eine Fehlerquelle ausgeschlossen werden, die durch die Länge der Versuchsdauer eine Rolle hätte spielen können.

ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die im unmittelbaren Anschluss an ein Moorbad feststellbare Hyaluronidasehemmung nach einem Zeitraum von einem Monat nicht mehr sichtbar ist. Dagegen war nach einer Moorbadserie von vier Wochen mit einer Badefrequenz von zwei Tagen auch einen Monat nach der letzten Behandlung noch die fast vollständige Hyaluronidasehemmung zu erkennen. Auch nach dieser Karenzzeit war diese Hemmung durch Ergotamintartrat- und Protaminsulfatinjektionen aufzuheben. Im Zusammenhang mit bereits vorliegenden Untersuchungen spricht dieses Ergebnis dafür, dass einer Katecholamin- und Heparinwirkung eine Bedeutung beim Aufrechterhalten der Hyaluronidasehemmung durch Moorbäder zuzuschreiben ist.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- 1 Mathies, H.: Med. Mschr. 12 (1958), 685
- 2 Mathies, H.: in Vorbereitung
- 3 Mathies, H. und Zschr. f. angew. Bäder-Klimaheilk., 5 (1958),
v. Werther, G.: 503
- 4 Rössch, U.: Diss. München in Vorbereitung
- 5 Jung, M.: Diss. München in Vorbereitung
- 6 Domenjoz, R.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol., 225 (1955)
14
- 7 Mathies, H.: Acta endocrinologica (eingereicht)
- 8 Scheufele, R.: Diss. München, 1958
- 9 Mathies, H.: in Vorbereitung
- 10 Schmidt, D.: Diss. München in Vorbereitung
- 11 Lignau, W.: Diss. München in Vorbereitung
- 12 Mathies, H. u. in Vorbereitung
Walcher, A.:
- 13 Maxein, H.: Diss. München in Vorbereitung
- 14 Mathies, H.: in Vorbereitung
- 15 Arnesen, K. u. Mitarb.: Proc. Soc. exper. Biol. a. M. 71
(1949), 264
- 16 Bacharach, A. L. u. Mitarb.: Biochem. J. 34 (1940), 1464
- 17 Hechter, O.: Ann. N. Y. Acad. Sci. 52 (1950), 1028
- 18 Humphrey, J. H.: Biochemic. J. 37 (1943), 177
- 19 Madinaveitia, J.: Biochemic. J. 32 (1938), 1806
- 20 Madinaveitia, J.: Biochemic. J. 33 (1939), 347
- 21 Meyer, K. u. Mitarb.: Proc. Soc. exper. Biol. a. Med. 44 (1940),
294
- 22 Gibian, H.: Erg. der Enzymforschung 13 (1954), 1
- 23 Fumy, A.: Diss. München in Vorbereitung
- 24 Schwank, M.: Diss. München in Vorbereitung
- 25 Mathies, H.: in Vorbereitung
- 26 Weiss, G.: Diss. München in Vorbereitung
- 27 Vogel, M.: Diss. München in Vorbereitung

Für die Überlassung des Themas darf ich abschliessend Herrn Professor Dr. W. Seitz danken.

Herrn Dr. H. Mathies danke ich, dass er mich zu dieser Arbeit anregte; für die während der Arbeit erwiesene Unterstützung ebenfalls Dank.

Herrn Dipl. Math. K. Liebrich sage ich Dank für die Beratung in der statistischen Auswertung.

Das Moorbad Neydharting stellte uns freundlicherweise die nötigen Versuchsmengen ihres Moorschwebstoffes zur Verfügung.

Lebenslauf

Am 13. Oktober 1927 wurde ich, Ernst Haupt, als Sohn des Landwirtes Anton Haupt und seiner Ehefrau Theresia, geb. Peschl, in Blumenau/Sudeten geboren.

Nach dem Volksschulbesuch von 1933 - 39 besuchte ich die "Oberschule für Jungen" in Zittau bis zur 6. Klasse im Jahre 1943. Am 1.9. d. Js. wurde ich zunächst zur Heimatflak und dann zur Wehrmacht eingezogen. Nach dem Zusammenbruch Deutschlands entliessen mich die Sowjets im Juli 1945 als Schwerverwundeten. Aus dem polnisch besetzten Schlesien, wo eine schulische Fortbildung unmöglich war, vertrieben, setzte ich in Bünde/Westfalen meine schulische Ausbildung fort, die durch Krieg und Nachkriegsereignisse, in deren Verlauf meine Eltern starben, unterbrochen worden war.

Am 12. März 1949 legte ich an dem neunklassigen Neusprachlichen Gymnasium zu Bünde die Reifeprüfung ab.

Nach darauf folgenden theologischen Studien an der Universität München und der philosophisch-theologischen Hochschule zu Königstein/Ts von 1950 - 1954, die ich mit dem theologischen Staatsexamen (2.Theologische Abschlussprüfung) verliess, begann ich das Medizinstudium im Sommersemester 1954 an der Ludwig-Maximilian-Universität zu München.

Die ärztliche Vorprüfung legte ich hier im Sommersemester 1956 ab. **Ärztliche Prüfung (18.12.59)**
u. Promotion (21.12.59)
ebenfalls an der Univ. München.

